

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-042871

(43)Date of publication of application : 17.02.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12N 9/12
 C12Q 1/68
 //C12N 15/09
 C12R 1:645)
 (C12N 9/12
 C12R 1:19)

(21)Application number : 08-198910

(71)Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22)Date of filing : 29.07.1996

(72)Inventor : KOMATSUBARA HIDESUKE
 KITABAYASHI MASAO
 KAMIMURA HIDEKI
 KAWAKAMI FUMIKIYO
 KAWAMURA YOSHIHISA
 TAKAGI MASAHIRO
 IMANAKA TADAYUKI

(54) HEAT RESISTANT DNA POLYMERASE HAVING REDUCED EXONUCLEASE ACTIVITY AND ITS USE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a heat resistant DNA polymerase having reduced exonuclease activities, by which an PCR(polymerase chain reaction) is carried out in good accuracy and amplifying ratio and with a wide tolerance of PCR condition by rearranging a specific part of the amino acid sequence of the heat resistant DNA polymerase having 3'-5' exonuclease activities.

SOLUTION: This heat resistant DNA polymerase having reduced exonuclease activities is the one having an amino acid sequence of X1DX2EX3 motif, in which at least one of X1-3 is substituted by other amino acids, existing in an EXO1 region in the amino acid sequence of the heat resistant DNA polymerase having 3'-5' exonuclease activities. The X1DX2EX3 motifs exemplified by PheAspIleGluThr. For example, the heat resistant DNA polymerase having reduced 3'-5' exonuclease activities compared to that of the natural one is obtained by inducing a mutation into a gene coding a natural KOD polymerase derived from Pyrococcus sp. KOD and using a protein engineering method.

DDP	DDP 1	DDP 2	DDP 3	DDP 4
P'1	UTTGCGGTTTAA	UTTGCGGTTTAA	UTTGCGGTTTAA	UTTGCGGTTTAA
P'2	CTTCGGGTTTAA	CTTCGGGTTTAA	CTTCGGGTTTAA	CTTCGGGTTTAA
DIG 711	GTGGGGGTTTAA	GTGGGGGTTTAA	GTGGGGGTTTAA	GTGGGGGTTTAA

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-42871

(43)公開日 平成10年(1998)2月17日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09 9/12	Z NA	9282-4B	C 12 N 15/00 9/12	Z NAA
C 12 Q 1/68		7823-4B	C 12 Q 1/68	Z
// (C 12 N 15/09 C 12 R 1:645)	Z NA			

審査請求 未請求 請求項の数26 OL (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-198910

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(22)出願日 平成8年(1996)7月29日

(72)発明者 小松原 秀介

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 北林 雅夫

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 上村 秀喜

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エキソヌクレアーゼ活性が低減された耐熱性DNAポリメラーゼおよびその用途

(57)【要約】

【課題】核酸の增幅効率が優れた新規な耐熱性DNAポリメラーゼを提供する。

【解決手段】3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1(EXO1)領域に存在するアミノ酸配列、X₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₁X₂およびX₃の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素であって、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼおよび該酵素を使用する核酸増幅法ならびにそのための試薬。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも20塩基/秒

熱安定性：pH 8.8にて95℃、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフのうち、X₁、X₂ およびX₃ の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素であることを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項2】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも20塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる。

【請求項3】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフのうち、X₁、X₂ およびX₃ の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項4】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第140番目、第142番目および第144番目の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項5】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をアスパラギン酸 (A s p) 、グルタミン酸 (G l u) 、アスパラギン (A s n) 、グルタミン (G l n) 、リジン (L y s) またはアルギニン (A r g) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項6】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をアスパラギン酸 (A s p) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項7】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をグルタミン酸 (G l u) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項8】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をアスパラギン (A s n) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項9】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をグルタミン (G l n) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項10】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をリジン (L y s) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項11】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (I I e) をアルギニン (A r g) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項12】 配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第144番目のX₃ (T h r) をバリン (V a l) に置換した請求項4記載の耐熱性DNAポリメラーゼ。

【請求項13】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフのうち、X₁、X₂ およびX₃ の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した新規な耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子。

【請求項14】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項13記載の耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも20塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で10%以上の残存活性を保持することができる。

【請求項15】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフのうち、X₁、X₂ およびX₃ の少

なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項16】 下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第140番目、第142番目および第144番目の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項17】 請求項13～16のいずれか1項に記載される遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組換えベクター。

【請求項18】 ベクターが、pLED-M1またはpBlue script由来のベクターである請求項17記載の遺伝子組換えベクター。

【請求項19】 請求項13～16のいずれか1項に記載される遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え宿主細胞。

【請求項20】 宿主細胞が大腸菌E. coliである請求項19記載の組換え宿主細胞。

【請求項21】 請求項13～16のいずれか1項に記載される遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え宿主細胞を培養し、培養物から耐熱性DNAポリメラーゼを採取することを特徴とする耐熱性DNAポリメラーゼの製造法。

【請求項22】 DNAを錠型とし、プライマー、dNTPおよび請求項1～12のいずれか1項に記載される耐熱性DNAポリメラーゼを反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅法。

【請求項23】 プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、一方は他方のDNA伸長生成物に相補的である請求項22記載の核酸増幅法。

【請求項24】 加熱および冷却を繰り返す請求項22記載の核酸増幅法。

【請求項25】 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび請求項1～12のいずれか1項記載の耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオンおよび緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【請求項26】 一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、

dNTPおよび請求項1～12のいずれか1項記載の耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンまたは/およびカリウムイオン、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はエキソヌクレアーゼ活性が低減された耐熱性DNAポリメラーゼおよび該酵素を用いた核酸の増幅方法ならびに該方法に使用する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等の核酸を増幅する技術に用いる耐熱性DNAポリメラーゼに関する研究が多くなされている。PCR反応に用いられる耐熱性DNAポリメラーゼは、主としてサーマス・サーモフィラス(*Thermus thermophilus*)由来のDNAポリメラーゼ(Tthポリメラーゼ)やサーマス・アクアチカス(*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)などが用いられてきた。しかしながら、これらの耐熱性DNAポリメラーゼは、核酸の取り込みの際の正確性に欠けたり、増幅効率が低いなどの問題がある。

【0003】また、超好熱始原菌由来のDNAポリメラーゼ、たとえばパイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Pfuポリメラーゼ、W092/09689、特開平5-328969号公報)、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Tliポリメラーゼ、特開平6-7160号公報)、パイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(KODポリメラーゼ、特開平7-298879号公報)なども知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】これら超好熱始原菌由来のポリメラーゼは3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が存在し、核酸の取り込みの際の正確性は、TaqポリメラーゼやTthポリメラーゼに比べて優れている。しかしながら、これらの耐熱性DNAポリメラーゼは核酸の増幅効率が充分でないなどの問題がある。また、超好熱始原菌、例えばパイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来のポリメラーゼは3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が存在し、PCRの反応時間、酵素量、プライマー濃度等の条件が狭いとの問題がある。

【0005】3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼを用いたPCR反応の上記問題点は、エキソヌクレアーゼ活性が強すぎることに起因すると考えられる。3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中には、このエキソヌクレアーゼに関して高度に保存されたアミノ酸領域が知られている(EXO I, EXO II, EXO III、図1)。

エキソ I (EXO I) 領域には $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフが存在し、これらのアミノ酸、D (アスパラギン酸) と E (グルタミン酸) はエキソヌクレアーゼ活性に必須であることが知られている。これらのアミノ酸、D と E を中性アミノ酸である A (アラニン) に置換することによって、エキソヌクレアーゼ活性を消失または 1 万分の 1 以下に低減させることができると報告されている (Kongら (1993)、Journal of Biological Chemistry, vol. 268, 1965-1975)。しかしながら、この場合は 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が弱くなりすぎており、核酸の取り込みの際の正確性や増幅効率に問題があり、新規な耐熱性 DNA ポリメラーゼが待ち望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼにおいて、該酵素の EXO I 領域に存在する $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、様々な強さの 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼが得られることを見い出した。更に、これら改変された耐熱性 DNA ポリメラーゼは、従来から PCR に使用されている耐熱性 DNA ポリメラーゼに比べて、正確性および増幅効率が優れていることを見いだし、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ I (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素であることを特徴とする耐熱性 DNA ポリメラーゼである。

【0008】また、本発明は 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ I (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼをコードする遺伝子である。

【0009】本発明は上記遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組換えベクターである。

【0010】本発明は上記遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え宿主細胞である。

【0011】本発明は上記遺伝子をベクターに挿入した遺伝子組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換した組換え宿主細胞を培養し、培養物から耐熱性 DNA ポリメラーゼを採取することを特徴とする耐熱性 DNA ポリメラーゼの製造法である。

【0012】本発明は DNA を錆型とし、プライマー、d NTP および上記耐熱性 DNA ポリメラーゼを反応さ

せて、プライマーを伸長して、DNA プライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸增幅法である。

【0013】本発明は、一方のプライマーが他方のプライマーの DNA 伸長生成物に相補的である 2 種のプライマー、d NTP および請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項記載の耐熱性 DNA ポリメラーゼ、2 倍イオン、1 倍イオンおよび緩衝液を含む核酸增幅用試薬である。

【0014】

【発明の実施態様】本発明の耐熱性 DNA ポリメラーゼは、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ I (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素であって、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフを含むエキソ I (EXO I) 領域を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼは、その起源を問わない。例えば、パイロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus) 由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス (Thermococcus litoralis) 由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼ、パイロコッカス (Pyrococcus) s.p. KOD 1 由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼ、サーモトガ・マリチマ (Thermotoga maritima) 由来の耐熱性 DNA ポリメラーゼなどが例示される。

【00015】本発明では、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ I (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することによって、改変前の酵素に比べて、95% 以下、好ましくは 90 ~ 0 % である 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が得られる。置換するアミノ酸の種類によって、種々の 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼが得られる。

【0016】本発明の一実施態様としては、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ I (EXO I) 領域に存在するアミノ酸配列、 $X_1 DX_2 EX_3$ モチーフのうち、 X_1 、 X_2 および X_3 の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素であり、さらに、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性 DNA ポリメラーゼがある。

作用：DNA 合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95% 以下である 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA 合成速度：少なくとも 20 塩基／秒

熱安定性：pH 8.8 (25°C での測定値) にて 95°C、6 時間の処理で 10 % 以上の残存活性を保持することができる。

【0017】また、本発明の別な実施態様としては、さ

らに下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【0018】本発明の別な実施態様としては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88~90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフのうち、少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0019】本発明では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼのアミノ酸配列中、エキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁ D X₂ EX₃ モチーフとしては、例えばPhe Asp Ile Glu Thrがある。

【0020】本発明の一実施態様としては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、95%以下である3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH 8.8 (25°Cでの測定値)にて95°C

A :	40 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	16 mM	塩化マグネシウム
	15 mM	ジチオスレイトール
	100 μg/ml	BSA
B :	2 μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C :	1.5 mM	dNTP (250 cpm/pmol [³ H] dTTP)
D :	20%	トリクロロ酢酸 (2 mMピロリン酸ナトリウム)
E :	1 μg/μl	キャリアーDNA

【0024】本発明において、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性とは、DNAの3'末端領域を切除し、5'-モノヌクレオチドを遊離する活性をいう。その活性測定法は、50 μlの反応液 (120mM Tris-HCl (pH 8.8 at

25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5 μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5 mlのエッペンチューブに分注し、DNAポリメラーゼを加える。75°C

℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75°C

分子量：88~90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第140番目、第142番目および第144番目の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0021】本発明のさらに具体的な例としては、配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第142番目のX₂ (Ile)をアスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、リジン (Lys)またはアルギニン (Arg)に置換した耐熱性DNAポリメラーゼなどが挙げられる。また、配列番号2に記載のアミノ酸配列中、第144番目のX₃ (Thr)をバリン (Val)に置換した耐熱性DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

【0022】本発明において、DNA合成活性とは錆型DNAにアニールされたオリゴヌクレオチドまたはボリヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にデオキシリボヌクレオシド5'-トリホスフェートのα-ホスフェートを共有結合せしめることにより、デオキシリボ核酸にデオキシリボヌクレオシド5'-モノホスフェートを錆型依存的に導入する反応を触媒する活性をいう。

【0023】その活性測定法は、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行う。本発明では、下記A液25 μl、B液およびC液各5 μlおよび滅菌水10 μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5 μlを加えて75°Cで10分間反応する。その後、氷冷し、E液50 μl、D液100 μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター (ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター (パックカード社製)で計測し、錆型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定する。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10 nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とする。

で10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50μl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合する。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離する。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカード社製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定する。

【0025】本発明において、DNA合成速度とは、単位時間当たりのDNAの合成数をいう。その測定法はDNAポリメラーゼの反応液(20mM Tris-HCl(pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム、7.5mM ジチオスレイトール、100 μg/ml BSA, 0.1mM dNTP, 0.2μCi [α -32P]dCTP)を、プライマーをアニーリングさせたM13mp18 1本鎖DNAと75℃で反応させる。反応停止は等量の反応停止液(50mM 水酸化ナトリウム、10mM EDTA, 5% フィコール、0.05% プロモフェノールブルー)を加えることにより行う。上記反応にて合成されたDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行う。DNAサイズマーカーとしてはラベルしたλ/HindIIIを用いる。このマーカーのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによって、DNA合成速度を求める。

【0026】本発明において、熱安定性とは、pH 8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理での残存活性を意味する。

【0027】これらの改変された酵素を製造する方法としては、天然型KODポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、蛋白工学的手法により、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する方法がある。

【0028】変異を導入するためのKODポリメラーゼをコードする遺伝子は特に限定されないが、本発明の一実施態様は、バイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD由来の配列表・配列番号3に記載の遺伝子を用いた。

【0029】本発明の別な実施態様は、配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子に変異を導入して、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する。

【0030】天然型KODポリメラーゼ遺伝子に変異を導入する方法は、既知のいかなる方法でも用いることができる。例えば天然型KODポリメラーゼ遺伝子DNAと変異源となる薬剤を接触させる方法や紫外線照射による方法などから、蛋白工学的な手法、例えばPCR法や部位特異的変異などの方法を用いることができる。また、遺伝子修復機構が欠損されたため、高頻度に遺伝子に変異が起こる大腸菌を用いた *in vivo*での変異の導入も可能である。本発明で使用したカメレオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)とは、

(1) 目的とする遺伝子を挿入したプラスミドを変性させ、該プラスミドに変異プライマーと選択プライマーとアニーリングさせる。(2) 次にDNAポリメラーゼでDNA合成を行った後、ライゲースにてライゲーション反応を行う。(3) 選択プライマー中に存在しないが、鋳型となるプラスミドに存在する制限酵素でプラスミドを切断し、変異の挿入されていないDNAを切断する。(4) 次に残されたプラスミドで大腸菌を形質転換する。(5) 形質転換体から変異プラスミドを調製し、(3),(4)を繰り返し、目的とする変異の挿入されたプラスミドを得る方法である。

【0031】上記改変ポリメラーゼ遺伝子をベクターに挿入して、例えば大腸菌を形質転換した後、アンピシリン等の薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばLB培地や2×YT培地に接種し、37℃で12~20時間培養した後、菌体を破碎して粗酵素液を抽出する。菌体を破碎する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば超音波処理やガラスピール破碎のような物理的破碎法やリゾームのような溶菌酵素を用いることができる。この粗酵素を熱処理、例えば80℃、30分間処理し、宿主由来のポリメラーゼを失活させ、DNAポリメラーゼ活性を測定する。次に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定し、両者の活性比率を天然型KODポリメラーゼを比較することにより、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の低下した酵素をスクリーニングすることができる。

【0032】上記方法により選抜された菌株から精製DNAポリメラーゼを取得する方法は、公知のいかなる手法を用いても良く、例えば下記方法がある。栄養培地に培養して得られた菌体を回収した後、酵素的または物理的破碎法により破碎抽出して粗酵素液を得る。得られた粗酵素抽出液から熱処理、例えば80℃、30分間処理し、その後、硫酸沈殿によりKODポリメラーゼ画分を回収する。この粗酵素液をセファデックスG-25(ファルマシア・バイオテク)ゲル濾過等の方法により脱塩を行うことができる。この操作の後、Qセファロース、ヘパリンセファロースなどのカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品はSDS-PAGEによってほぼ单一のバンドを示す程度に純化される。

【0033】本発明の改変された耐熱性DNAポリメラーゼを使用して、DNAを鋳型とし、プライマー、dNTPを反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することができる。プライマーは2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーであることが好ましい。また、加熱および冷却を繰り返す。本発明のDNAポリメラーゼは、その活性を維持するために、2価イオン、例えばマグネシウムイオンおよび1価イオン、例えばアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン

を共存させることができ。また、PCR反応液には、緩衝液およびこれらのイオンを含むとともに、BSA、非イオン界面活性剤、例えばTriton X-100および緩衝液が存在していてもよい。

【0034】本発明の核酸増幅用試薬は、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記耐熱性DNAポリメラーゼ、2価イオン、1価イオンおよび緩衝液を含み、さらに具体的には、一方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記耐熱性DNAポリメラーゼ、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンまたは/およびカリウムイオン、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む。

【0035】次に実施例を用いて本発明を説明する。

参考例1

超好熱始原菌KOD由来のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

鹿児島県子宝島にて単離した超好熱始原菌KOD1株を95℃にて培養後、菌体を回収した。得られた菌体から常法に従い、超好熱始原菌KOD株の染色体DNAを調製した。パイルコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来のDNAポリメラーゼ(Pfuポリメラーゼ)の保存領域アミノ酸配列に基づき、2種のプライマー(5'-GGATTAGTATACTGCCAATGGSSGGCGA-3' および5'-GAGGGCAGAGTTTATTCCGAGCTT-3')を合成した。この2種のプライマーを使用し、調製したDNAを鋳型として、PCR反応を行った。

【0036】PCR増幅DNA断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を決定した後、この増幅DNA断片をプローブとして、KOD1株染色体DNA制限酵素処理産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、DNAポリメラーゼをコードする断片のサイズを求めた

(約4~7Kbp)。さらに、この大きさのDNA断片をアガロースゲルから回収し、プラスミドpBS(ストラタジーン社製)に挿入し、これらの混合物より大腸菌(*E.coli* JM109)を形質転換して、ライプラリーを作製した。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライプラリーから、KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有すると考えられるクローニング株(*E.coli* JM109/pSBKOD1)を取得した。

【0037】取得したクローニング株、(*E.coli* JM109/pSBKOD1)よりプラスミド、pSBKOD1を回収し、常法に従い、塩基配列を決定した。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子は5010塩基からなり、1670個のアミノ酸がコードされていた(配列番号1)。

【0038】完全なポリメラーゼ遺伝子を作成するため、2箇所の介在配列(1374~2453bp: 27

08~4316bp)をPCR融合法により取り除いた。PCR融合法では、クローニング株より回収したプラスミドを鋳型に、3組のプライマーを組み合わせて、各々PCRを行い、介在配列を除いた3断片を増幅した。この際、PCRに用いるプライマーは、他の断片と結合する側に結合相手と同様な配列がくるように設計した。また、両端には別々な制限酵素サイト(N末端側: EcoRV、C末端側: BamHI)が創出されるように設計した。次いで、PCR増幅断片中、構造上中央に位置する断片と、N末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。また、同様に構造上、中央に位置する断片と、C末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。このようにして得られた2種の断片を用いて再度PCRを行い、介在配列が取り除かれ、N末端にEcoRV、C末端にBamHIサイトを有するKOD1株由来のDNAポリメラーゼをコードする完全な形の遺伝子断片を取得した。更に、同遺伝子をT7プロモーターで誘導可能な発現ベクター、pET-8c(NcoI/BamHIサイト)、先に創出した制限酵素サイトを利用し、サブクローニングして、組換え発現ベクター(pET-po1)を得た。なお、*E.coli* BL21(DE3)/pET-po1は、生命工学工業研究所へ寄託されている(FERM BP-5513)。

【0039】実施例1

KODポリメラーゼ遺伝子のサブクローニング

耐熱性DNAポリメラーゼを改変するために、プラスミドpET-po1からKODポリメラーゼ遺伝子を切り出し、pBlue scriptにサブクローニングした。すなわちpET-po1を制限酵素、XbaIとBamHI(東洋紡製)で切断し、約2.3kbのKODポリメラーゼ遺伝子を切り出した。次にこのDNA断片をライゲーションキット(東洋紡製 Ligation high)を用いて、XbaIとBamHIで切断したプラスミドpBlue script SK(-)と連結した。次に、市販のコンピテントセル(東洋紡製 competent high JM109)を用いて形質転換を行った。100μg/mlのアンビシリンを含んだLB寒天培地(1%バクトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、ギブコ社製)で35℃で16時間培養し、得られたコロニーからプラスミドを調製した。さらに、部分塩基配列を確認してKODポリメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpKOD1を得た。

【0040】実施例2

改変型遺伝子(IN)の作製および改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例1で得られたプラスミドpKOD1を用いて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをアスパラギンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子

をもつプラスミドを作製した (pKODIN)。作製はカメレオンsite-directed mutagenesisキット (ストラタジーン社製) を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号5に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読で行った。得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、JM109 (pKODIN)を得た。

【0041】滅菌処理した100μg/mlのアンピシリンを含んだTB培地 (Molecular Cloning, p. A. 2に記載) 6Lを10Lジャーファーメンターに分注した。この培地に予め100μg/mlのアンピシリンを含んだ50mlのLB培地 (1%バクトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、ギブコ社製) で30℃、16時間培養した大腸菌JM109 (pKODIN) (500ml坂口プラスコ

(試薬)

A:	40mM	Tris-HCl (pH 7.5)
	16mM	塩化マグネシウム
	15mM	ジチオスレイトール
	100μg/ml	BSA
B:	2μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C:	1.5mM	dNTP (250cpm/pmol [³ H] dTTP)
D:	20%	トリクロロ酢酸 (2mMピロリン酸ナトリウム)
E:	1μg/μl	キャリアーDNA

【0043】(方法) A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合後、上記熱処理液5μlを加えて75℃で10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μl、D液100μlを加えて、攪拌後さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター (ワットマンGF/Cフィルター) で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター (パッカード社製) で計測し、鋳型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定した。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0044】実施例3

変異体 (IE) 遺伝子の作製および改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKODIE)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号6に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ (IE)を得た。

【0045】実施例4

変異体 (IQ) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

使用) を接種し、35℃で12時間通気攪拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA) に懸濁後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を85℃にて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンイミンを用いた除核酸処理、硫安分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1%ノニデットP40, 50%グリセリン) に置換し、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ (IQ)を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作を行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0042】

リメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKODIQ)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号7に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ (IQ)を得た。

【0046】実施例5

変異体 (ID) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKODID)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号8に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ (ID)を得た。

【0047】実施例6

変異体 (TV) 遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁

ΔX_2 ΔX_3 モチーフのうち、 X_3 のチロシンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKODTV)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(TV)を得た。

【0048】実施例7

変異体(IK)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にてEXO1領域に存在する X_1 ΔX_2 ΔX_3 モチーフのXのうち、 X_2 のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKODIK)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(IK)を得た。

【0049】実施例8

変異体(IR)遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

実施例2と同様の方法にてEXO1領域に存在する X_1 ΔX_2 ΔX_3 モチーフのXのうち、 X_2 のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した(pKODIR)。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に、実施例2と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(IR)を得た。

【0050】実施例9

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記実施例2～8で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ(東洋紡製)を用いた。50μlの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA)を1.5mlのエッペンチューブに分注し、上記DNAポリメラーゼをそれぞれ0.5ユニット、1ユニット、1.5ユニット加えて、75°Cで10分間反応させた。冰冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして0.1%のBSAを50ml加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(パッカード社製)で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。図2に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNA

の分解率を示した。更に天然型のKODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比を図3に示した。このように本発明によれば様々な強さの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼが得られることを示した。天然型のKODポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に対して、INは約95%、IEは約76%、IQは約64%、IDは約52%、TVは約48%、IKは約30%、IRは約0%の同活性を有していた。

【0051】実施例10

改変型DNAポリメラーゼを用いたPCR

天然型KODポリメラーゼまたは改変型耐熱性DNAポリメラーゼIN, IE, IQ, ID, TV, IK, IRを用いて、PCR反応を行った。50mlの反応液(120mM Tris-HCl(pH8.0 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 1ng の制限酵素ScaIで直鎖状にしたプラスミドpBR322、10ピコモルの配列表12、13記載のプライマー)に各酵素を2.5ユニット加えてPCR反応を行った。サーマルサイクラーはパーキンエルマー社製のモデルPJ2000を用いた。また反応条件は94°C、30秒→68°C、2分30秒を25サイクル行った。また、Taqポリメラーゼ(東洋紡製)も同様にしてPCR反応を行った。ただし、反応液組成は(10mM Tris-HCl(pH8.8 at 25°C), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.1% Triton X-100, 1ng の制限酵素ScaIで直鎖状にしたプラスミドpBR322、10ピコモルの配列表12および13記載のプライマー)で行った。反応終了後、5mlの反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約4.3kbのターゲットの増幅を確認した。図4にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。この結果、改変型DNAポリメラーゼIN, IE, IQ, ID, TV, IK, IRを用いてPCRを行った場合、天然型のKODポリメラーゼを用いるよりも良好な増幅であった。

【0052】実施例11

改変型DNAポリメラーゼのPCRでのDNA合成の正確性の測定

天然型のKODポリメラーゼ、改変型耐熱性DNAポリメラーゼIE、ID、IK、IRおよびTaqポリメラーゼについて、PCRでのDNA合成の正確性を以下の方法にて測定した。プラスミドpUR288(Current Protocols in Molecular Biology 1.5.6に記載)を制限酵素ScaIで切断した。このプラスミドを1ng用いて実施例10記載の方法と同様の方法にてPCRを行った。反応終了後、5μlの反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約5.3kbのターゲットの増幅を確認した。残りの反応液をフェノール/クロロホルム処理し、次にエタノール沈殿を行った。沈殿を乾燥後50μlのH₂Oバッファー(50mM Tris-HCl(pH7.5), 100mM

NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT)に溶解した。さらに制限酵素Sca I (東洋紡製)を10ユニット加えて、37℃で16時間反応させた。アガロースゲル電気泳動にて目的の増幅産物を分離し、その部分のアガロースを切り出した。このアガロースからジーンクリーン2 (BI0101社製)を用いてDNAを精製した。精製したDNA 10ngを10μlになるようにTEバッファー (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)で希釈し、ライゲーションキット (東洋紡製 Ligation high) の反応液10μlを加えて16℃で30分間反応した。次に市販のコンピーテントセル (東洋紡製 competent high JM109) を用いて形質転換を行った。

【0053】100μg/mlのアンビシリン、1mMのイソプロピルチオ-β-ガラクトシド (IPTG、ナカライテスク社製)、0.7%の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド (X-gal)

	KOD	IE	ID	IK	IR	rTaq
全コロニー	2394	3267	4869	2826	1197	2831
変異コロニー	19	63	148	362	299	795
変異率(%)	0.79	1.9	3.0	12.8	25.0	28.1

【0055】表1に示したように、本発明で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼIE、ID、IK、IRは、天然型のKODポリメラーゼには劣るもの、Taqポリメラーゼより変異率が低く、すなわちDNA合成の正確性が高かった。

【0056】

【発明の効果】本発明では、例えばパイロコッカス (Pyrrococcus) sp. KOD 1由来のDNAポリメラーゼのDNAの合成速度や熱安定性を保持したまま、改変前の該酵素に比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を低下させた改変型耐熱性酵素を作り出すことができた。また、DNA合成速度が少なくとも20塩基/秒であって、pH 8.8 (25℃での測定値)にて95℃、6時間処理で10%以上の残存活性を保持することができる耐熱性DNAポリメラーゼであって、改変前の酵素に比べて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した酵

(ナカライテスク社製)を含んだLB寒天培地 (1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、ギブコ社製)で35℃で16時間培養し、コロニーをカウントした。pUR288にはlacZ遺伝子 (β-ガラクトシダーゼ)が存在する。従って、PCR中のDNA合成が正確に行われた場合、上記寒天培地では青いコロニーを形成する。逆にDNA合成中に誤りが起こり、lacZ遺伝子のコードするβ-ガラクトシダーゼ活性が低下あるいは消失した場合、薄い青色ないしは白色のコロニーを形成する。この薄い青コロニーと白コロニーを変異コロニーとして、各酵素を用いた場合の変異率(%)を表1に示した。

【0054】

【表1】

素を用いることにより、改変前の酵素を用いるよりも増幅効率が上昇する。

【0057】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 5342

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: 超好熱始原菌

株名: KOD 1

配列の特徴

156-5165 P CDS

1374-2453 介在配列

2708-4316 介在配列

配列

GCTTGAGGGC CTGCGTTAT GGGACGTTGC AGTTTGC GCC TACTCAAAGA TGCCGGTTTT 60

ATAACGGAGA AAAATGGGGA GCTATTACGA TCTCTCCTTG ATGTGGGTT TACAATAAAC 120

CCTGGATTGT TCTACAAGAT TATGGGGAT GAAAG ATG ATC CTC GAC ACT GAC 173

Met Ile Leu Asp Thr Asp

1 5

TAC ATA ACC GAG GAT GGA AAG CCT GTC ATA AGA ATT TTC AAG AAG GAA 221

Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Glu

10 15 20

AAC GGC GAG TTT AAG ATT GAG TAC GAC CGG ACT TTT GAA CCC TAC TTC 269

Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe

25 30 35

TAC GCC CTC CTG AAG GAC GAT TCT GCC ATT GAG GAA GTC AAG AAG ATA 317

Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Glu Val Lys Ile

40	45	50	
ACC GCC GAG AGG CAC GGG ACG GTT GTA ACG GTT AAG CGG GTT GAA AAG			365
Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr Val Lys Arg Val Glu Lys			
55	60	65	70
GTT CAG AAG AAG TTC CTC GGG AGA CCA GTT GAG GTC TGG AAA CTC TAC			413
Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Trp Lys Leu Tyr			
75	80	85	
TTT ACT CAT CCG CAG GAC GTC CCA GCG ATA AGG GAC AAG ATA CGA GAG			461
Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu			
90	95	100	
CAT GGA GCA GTT ATT GAC ATC TAC GAG TAC GAC ATA CCC TTC GCC AAG			509
His Gly Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys			
105	110	115	
CGC TAC CTC ATA GAC AAC GGA TTA GTG CCA ATG GAA GGC GAC GAG GAG			557
Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu			
120	125	130	
CTG AAA ATG CTC GCC TTC GAC ATT GAA ACT CTC TAC CAT GAG GGC GAG			605
Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu			
135	140	145	150
GAG TTC GCC GAG GGG CCA ATC CTT ATG ATA AGC TAC GCC GAC GAG GAA			653
Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu			
155	160	165	
GGG GCC AGG GTG ATA ACT TGG AAG AAC GTG GAT CTC CCC TAC GTT GAC			701
Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val Asp Leu Pro Tyr Val Asp			
170	175	180	
GTC GTC TCG ACG GAG AGG GAG ATG ATA AAG CGC TTC CTC CGT GTT GTG			749
Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val			
185	190	195	
AAG GAG AAA GAC CCG GAC GTT CTC ATA ACC TAC AAC GGC GAC AAC TTC			797
Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe			
200	205	210	
GAC TTC GCC TAT CTG AAA AAG CGC TGT GAA AAG CTC GGA ATA AAC TTC			845
Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Arg Cys Glu Lys Leu Gly Ile Asn Phe			
215	220	225	230
GCC CTC GGA AGG GAT GGA AGC GAG CCG AAG ATT CAG AGG ATG GGC GAC			893
Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp			
235	240	245	
AGG TTT GCC GTC GAA GTG AAG GGA CGG ATA CAC TTC GAT CTC TAT CCT			941
Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro			
250	255	260	
GTG ATA AGA CGG ACG ATA AAC CTG CCC ACA TAC ACG CTT GAG GCC GTT			989
Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val			
265	270	275	
TAT GAA GCC GTC TTC GGT CAG CCG AAG GAG AAG GTT TAC GCT GAG GAA			1037
Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu			
280	285	290	
ATA ACA CCA GCC TGG GAA ACC GGC GAG AAC CTT GAG AGA GTC GCC CGC			1085
Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn Leu Glu Arg Val Ala Arg			
295	300	305	310
TAC TCG ATG GAA GAT GCG AAG GTC ACA TAC GAG CTT GGG AAG GAG TTC			1133

Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Phe			
315	320	325	
CTT CCG ATG GAG GCC CAG CTT TCT CGC TTA ATC GGC CAG TCC CTC TGG	1181		
Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp			
330	335	340	
GAC GTC TCC CGC TCC AGC ACT GGC AAC CTC GTT GAG TGG TTC CTC CTC	1229		
Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu			
345	350	355	
AGG AAG GCC TAT GAG AGG AAT GAG CTG GCC CCG AAC AAG CCC GAT GAA	1277		
Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu			
360	365	370	
AAG GAG CTG GCC AGA AGA CGG CAG AGC TAT GAA GGA GGC TAT GTA AAA	1325		
Lys Glu Leu Ala Arg Arg Gln Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys			
375	380	385	390
GAG CCC GAG AGA GGG TTG TGG GAG AAC ATA GTG TAC CTA GAT TTT AGA	1373		
Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg			
395	400	405	
TGC CAT CCA GCC GAT ACG AAG GTT GTC GTC AAG GGG AAG GGG ATT ATA	1421		
Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Val Val Lys Gly Lys Gly Ile Ile			
410	415	420	
AAC ATC AGC GAG GTT CAG GAA GGT GAC TAT GTC CTT GGG ATT GAC GGC	1469		
Asn Ile Ser Glu Val Gln Glu Gly Asp Tyr Val Leu Gly Ile Asp Gly			
425	430	435	
TGG CAG AGA GTT AGA AAA GTA TGG GAA TAC GAC TAC AAA GGG GAG CTT	1517		
Trp Gln Arg Val Arg Lys Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Lys Gly Glu Leu			
440	445	450	
GTA AAC ATA AAC GGG TTA AAG TGT ACG CCC AAT CAT AAG CTT CCC GTT	1565		
Val Asn Ile Asn Gly Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val			
455	460	465	470
GTT ACA AAG AAC GAA CGA CAA ACG AGA ATA AGA GAC AGT CTT GCT AAG	1613		
Val Thr Lys Asn Glu Arg Gln Thr Arg Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys			
475	480	485	
TCT TTC CTT ACT AAA AAA GTT AAG GGC AAG ATA ATA ACC ACT CCC CTT	1661		
Ser Phe Leu Thr Lys Val Lys Gly Lys Ile Ile Thr Thr Pro Leu			
490	495	500	
TTC TAT GAA ATA GCC AGA GCG ACA ACT GAG AAT ATT CCA GAA GAA GAG	1709		
Phe Tyr Glu Ile Gly Arg Ala Thr Ser Glu Asn Ile Pro Glu Glu Glu			
505	510	515	
GTT CTC AAG GGA GAG CTC GCT GGC ATA CTA TTG GCT GAA GGA ACC CTC	1757		
Val Leu Lys Gly Glu Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Gly Thr Leu			
520	525	530	
TTG AGG AAA GAC GTT GAA TAC TTT GAT TCA TCC CGC AAA AAA CGG AGG	1805		
Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Ser Arg Lys Lys Arg Arg			
535	540	545	550
ATT TCA CAC CAG TAT CGT GTT GAG ATA ACC ATT GGG AAA GAC GAG GAG	1853		
Ile Ser His Gln Tyr Arg Val Glu Ile Thr Ile Gly Lys Asp Glu Glu			
555	560	565	
GAG TTT AGG GAT CGT ATC ACA TAC ATT TTT GAG CGT TTG TTT GGG ATT	1901		
Glu Phe Arg Asp Arg Ile Thr Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Gly Ile			
570	575	580	

ACT CCA AGC ATC TCG GAG AAG AAA GGA ACT AAC GCA GTA ACA CTC AAA		1949	
Thr Pro Ser Ile Ser Glu Lys Lys Gly Thr Asn Ala Val Thr Leu Lys			
585	590	595	
GTT GCG AAG AAG AAT GTT TAT CTT AAA GTC AAG GAA ATT ATG GAC AAC		1997	
Val Ala Lys Lys Asn Val Tyr Leu Lys Val Lys Glu Ile Met Asp Asn			
600	605	610	
ATA GAG TCC CTA CAT GCC CCC TCG GTT CTC AGG GGA TTC TTC GAA GGC		2045	
Ile Glu Ser Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Phe Glu Gly			
615	620	625	630
GAC GGT TCA GTA AAC AGG GTT AGG AGG AGT ATT GTT GCA ACC CAG GGT		2093	
Asp Gly Ser Val Asn Arg Val Arg Arg Ser Ile Val Ala Thr Gln Gly			
635	640	645	
ACA AAG AAC GAG TGG AAG ATT AAA CTG GTG TCA AAA CTG CTC TCC CAG		2141	
Thr Lys Asn Glu Trp Lys Ile Lys Leu Val Ser Lys Leu Leu Ser Gln			
650	655	660	
CTT GGT ATC CCT CAT CAA ACG TAC ACG TAT CAG TAT CAG GAA AAT GGG		2189	
Leu Gly Ile Pro His Gln Thr Tyr Thr Tyr Gln Tyr Gln Glu Asn Gly			
665	670	675	
AAA GAT CGG AGC AGG TAT ATA CTG GAG ATA ACT GGA AAG GAC GGA TTG		2237	
Lys Asp Arg Ser Arg Tyr Ile Leu Glu Ile Thr Gly Lys Asp Gly Leu			
680	685	690	
ATA CTG TTC CAA ACA CTC ATT GGA TTC ATC AGT GAA AGA AAG AAC GCT		2285	
Ile Leu Phe Gln Thr Leu Ile Gly Phe Ile Ser Glu Arg Lys Asn Ala			
695	700	705	710
CTG CTT AAT AAG GCA ATA TCT CAG AGG GAA ATG AAC AAC TTG GAA AAC		2333	
Leu Leu Asn Lys Ala Ile Ser Gln Arg Glu Met Asn Asn Leu Glu Asn			
715	720	725	
AAT GGA TTT TAC AGG CTC AGT GAA TTC AAT GTC AGC ACG GAA TAC TAT		2381	
Asn Gly Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Phe Asn Val Ser Thr Glu Tyr Tyr			
730	735	740	
GAG GGC AAG GTC TAT GAC TTA ACT CTT GAA GGA ACT CCC TAC TAC TTT		2429	
Glu Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe			
745	750	755	
GCC AAT GGC ATA TTG ACC CAT AAC TCC CTG TAC CCC TCA ATC ATC ATC		2477	
Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile			
760	765	770	
ACC CAC AAC GTC TCG CCG GAT ACG CTC AAC AGA GAA GGA TGC AAG GAA		2525	
Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu			
775	780	785	790
TAT GAC GTT GCC CCA CAG GTC GGC CAC CGC TTC TGC AAG GAC TTC CCA		2573	
Tyr Asp Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro			
795	800	805	
GGA TTT ATC CCG AGC CTG CTT GGA GAC CTC CTA GAG GAG AGG CAG AAG		2621	
Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys			
810	815	820	
ATA AAG AAG AAG ATG AAG GCC ACG ATT GAC CCG ATC GAG AGG AAG CTC		2669	
Ile Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu			
825	830	835	
CTC GAT TAC AGG CAG AGG GCC ATC AAG ATC CTG GCA AAC AGC ATC CTA		2717	
Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu			

840	845	850	
CCC GAG GAA TGG CTT CCA GTC CTC GAG GAA GGG GAG GTT CAC TTC GTC			2765
Pro Glu Glu Trp Leu Pro Val Leu Glu Glu Gly Glu Val His Phe Val			
855	860	865	870
AGG ATT GGA GAG CTC ATA GAC CGG ATG ATG GAG GAA AAT GCT GGG AAA			2813
Arg Ile Gly Glu Leu Ile Asp Arg Met Met Glu Glu Asn Ala Gly Lys			
875	880	885	
GTA AAG AGA GAG GGC GAG ACG GAA GTG CTT GAG GTC AGT GGG CTT GAA			2861
Val Lys Arg Glu Gly Glu Thr Glu Val Leu Glu Val Ser Gly Leu Glu			
890	895	900	
GTC CCG TCC TTT AAC AGG AGA ACT AAC AAG GCC GAG CTC AAG AGA GTA			2909
Val Pro Ser Phe Asn Arg Arg Thr Asn Lys Ala Glu Leu Lys Arg Val			
905	910	915	
AAG GCC CTG ATT AGG CAC GAT TAT TCT GGC AAG GTC TAC ACC ATC AGA			2957
Lys Ala Leu Ile Arg His Asp Tyr Ser Gly Lys Val Tyr Thr Ile Arg			
920	925	930	
CTG AAG TCG GGG AGG AGA ATA AAG ATA ACC TCT GGC CAC AGC CTC TTC			3005
Leu Lys Ser Gly Arg Arg Ile Lys Ile Thr Ser Gly His Ser Leu Phe			
935	940	945	950
TCT GTG AGA AAC GGG GAG CTC GTT GAA GTT ACG GGC GAT GAA CTA AAG			3053
Ser Val Arg Asn Gly Glu Leu Val Glu Val Thr Gly Asp Glu Leu Lys			
955	960	965	
CCA GGT GAC CTC GTT GCA GTC CCG CGG AGA TTG GAG CTT CCT GAG AGA			3101
Pro Gly Asp Leu Val Ala Val Pro Arg Arg Leu Glu Leu Pro Glu Arg			
970	975	980	
AAC CAC GTG CTG AAC CTC GTT GAA CTG CTC CTT GGA ACG CCA GAA GAA			3149
Asn His Val Leu Asn Leu Val Glu Leu Leu Leu Gly Thr Pro Glu Glu			
985	990	995	
GAA ACT TTG GAC ATC GTC ATG ACG ATC CCA GTC AAG GGT AAG AAG AAC			3197
Glu Thr Leu Asp Ile Val Met Thr Ile Pro Val Lys Gly Lys Lys Asn			
1000	1005	1010	
TTC TTT AAA GGG ATG CTC AGG ACT TTG CGC TGG ATT TTC GGA GAG GAA			3245
Phe Phe Lys Gly Met Leu Arg Thr Leu Arg Trp Ile Phe Gly Glu Glu			
1015	1020	1025	1030
AAG AGG CCC AGA ACC GCG AGA CGC TAT CTC AGG CAC CTT GAG GAT CTG			3293
Lys Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Leu Arg His Leu Glu Asp Leu			
1035	1040	1045	
GGC TAT GTC CGG CTT AAG AAG ATC GGC TAC GAA GTC CTC GAC TGG GAC			3341
Gly Tyr Val Arg Leu Lys Lys Ile Gly Tyr Glu Val Leu Asp Trp Asp			
1050	1055	1060	
TCA CTT AAG AAC TAC AGA AGG CTC TAC GAG GCG CTT GTC GAG AAC GTC			3389
Ser Leu Lys Asn Tyr Arg Arg Leu Tyr Glu Ala Leu Val Glu Asn Val			
1065	1070	1075	
AGA TAC AAC GGC AAC AAG AGG GAG TAC CTC GTT GAA TTC AAT TCC ATC			3437
Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Arg Glu Tyr Leu Val Glu Phe Asn Ser Ile			
1080	1085	1090	
CGG GAT GCA GTT GGC ATA ATG CCC CTA AAA GAG CTG AAG GAG TGG AAG			3485
Arg Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Leu Lys Glu Leu Lys Glu Trp Lys			
1095	1100	1105	1110
ATC GGC ACG CTG AAC GGC TTC AGA ATG AGA AAG CTC ATT GAA GTG GAC			3533

Ile Gly Thr Leu Asn Gly Phe Arg Met Arg Lys Leu Ile Glu Val Asp			
1115	1120	1125	
GAG TCG TTA GCA AAG CTC CTC GGC TAC TAC GTG AGC GAG GGC TAT GCA	3581		
Glu Ser Leu Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Ala			
1130	1135	1140	
AGA AAG CAG AGG AAT CCC AAA AAC GGC TGG AGC TAC AGC GTG AAG CTC	3629		
Arg Lys Gln Arg Asn Pro Lys Asn Gly Trp Ser Tyr Ser Val Lys Leu			
1145.	1150	1155	
TAC AAC GAA GAC CCT GAA GTG CTG GAC GAT ATG GAG AGA CTC GCC AGC	3677		
Tyr Asn Glu Asp Pro Glu Val Leu Asp Asp Met Glu Arg Leu Ala Ser			
1160	1165	1170	
AGG TTT TTC GGG AAG GTG AGG CCG GGC AGG AAC TAC GTT GAG ATA CCG	3725		
Arg Phe Phe Gly Lys Val Arg Arg Gly Arg Asn Tyr Val Glu Ile Pro			
1175	1180	1185	1190
AAG AAG ATC GGC TAC CTG CTC TTT GAG AAC ATG TGC GGT GTC CTA GCG	3773		
Lys Lys Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Glu Asn Met Cys Gly Val Leu Ala			
1195	1200	1205	
GAG AAC AAG AGG ATT CCC GAG TTC GTC TTC ACG TCC CCG AAA GGG GTT	3821		
Glu Asn Lys Arg Ile Pro Glu Phe Val Phe Thr Ser Pro Lys Gly Val			
1210	1215	1220	
CGG CTG GCC TTC CTT GAG GGG TAC TCA TCG GCG ATG GCG ACG TCC ACC	3869		
Arg Leu Ala Phe Leu Glu Gly Tyr Ser Ser Ala Met Ala Thr Ser Thr			
1225	1230	1235	
GAA CAA GAG ACT CAG GCT CTC AAC GAA AAG CGA GCT TTA GCG AAC CAG	3917		
Glu Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asn Glu Lys Arg Ala Leu Ala Asn Gln			
1240	1245	1250	
CTC GTC CTC CTC TTG AAC TCG GTG GGG GTC TCT GCT GTA AAA CTT GGG	3965		
Leu Val Leu Leu Asn Ser Val Gly Val Ser Ala Val Lys Leu Gly			
1255	1260	1265	1270
CAC GAC AGC GGC GTT TAC AGG GTC TAT ATA AAC GAG GAG CTC CCG TTC	4013		
His Asp Ser Gly Val Tyr Arg Val Tyr Ile Asn Glu Glu Leu Pro Phe			
1275	1280	1285	
CTA AAG CTG GAC AAG AAA AAG AAC GCC TAC TAC TCA CAC GTG ATC CCC	4061		
Val Lys Leu Asp Lys Lys Asn Ala Tyr Tyr Ser His Val Ile Pro			
1290	1295	1300	
AAG GAA GTC CTG AGC GAG GTC TTT GGG AAG GTT TTC CAG AAA AAC GTC	4109		
Lys Glu Val Leu Ser Glu Val Phe Gly Lys Val Phe Gln Lys Asn Val			
1305	1310	1315	
AGT CCT CAG ACC TTC AGC AAG ATG GTC GAG GAC GGA AGA CTC GAT CCC	4157		
Ser Pro Gln Thr Phe Arg Lys Met Val Glu Asp Gly Arg Leu Asp Pro			
1320	1325	1330	
GAA AAG GCC CAG AGG CTC TCC TGG CTC ATT GAG GGG GAC GTC GTG CTC	4205		
Glu Lys Ala Gln Arg Leu Ser Trp Leu Ile Glu Gly Asp Val Val Leu			
1335	1340	1345	1350
GAC CGC GTT GAG TCC GTT GAT GTG GAA GAC TAC GAT GGT TAT GTC TAT	4253		
Asp Arg Val Glu Ser Val Asp Val Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Tyr			
1355	1360	1365	
GAC CTG AGC GTC GAG GAC AAC GAG AAC TTC CTC GTT GGC TTT GGG TTG	4301		
Asp Leu Ser Val Glu Asp Asn Glu Asn Phe Leu Val Gly Phe Gly Leu			
1370	1375	1380	

GTC TAT GCT CAC AAC AGC TAC TAC GGT TAC TAC GGC TAT GCA AGG GCG 4349
 Val Tyr Ala His Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala
 1385 1390 1395
 CGC TGG TAC TGC AAG GAG TGT GCA GAG AGC GTA ACG GCC TGG GGA AGG 4397
 Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg
 1400 1405 1410
 GAG TAC ATA ACG ATG ACC ATC AAG GAG ATA GAG GAA AAG TAC GGC TTT 4445
 Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile Glu Glu Lys Tyr Gly Phe
 1415 1420 1425 1430
 AAG GTA ATC TAC AGC GAC ACC GAC GGA TTT TTT GCC ACA ATA CCT CGA 4493
 Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly
 1435 1440 1445
 GCC GAT GCT GAA ACC GTC AAA AAG AAG GCT ATG GAG TTC CTC AAC TAT 4541
 Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala Met Glu Phe Leu Asn Tyr
 1450 1455 1460
 ATC AAC GCC AAA CTT CCG GGC GCG CTT GAG CTC GAG TAC GAG GGC TTC 4589
 Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe
 1465 1470 1475
 TAC AAA CGC GGC TTC TTC GTC ACG AAG AAG TAT GCG GTG ATA GAC 4637
 Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp
 1480 1485 1490
 GAG GAA GGC AAG ATA ACA ACG CGC GGA CTT GAG ATT GTG AGG CGT GAC 4685
 Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp
 1495 1500 1505 1510
 TGG AGC GAG ATA GCG AAA GAG ACG CAG GCG AGG GTT CTT GAA GCT TTG 4733
 Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Leu
 1515 1520 1525
 CTA AAG GAC GGT GAC GTC GAG AAG GCC GTG AGG ATA GTC AAA GAA GTT 4781
 Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val
 1530 1535 1540
 ACC GAA AAG CTG AGC AAG TAC GAG GTT CCG CCG GAG AAG CTG GTG ATC 4829
 Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile
 1545 1550 1555
 CAC GAG CAG ATA ACG AGG GAT TTA AAG GAC TAC AAG GCA ACC GGT CCC 4877
 His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro
 1560 1565 1570
 CAC GTT GCC GTT GCC AAG AGG TTG GCC GCG AGA GGA GTC AAA ATA CGC 4925
 His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Ile Arg
 1575 1580 1585 1590
 CCT GGA ACG GTG ATA AGC TAC ATC GTG CTC AAG GGC TCT GGG AGG ATA 4973
 Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile
 1595 1600 1605
 GGC GAC AGG GCG ATA CCG TTC GAC GAG TTC GAC CCG ACG AAG CAC AAG 5021
 Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Lys
 1610 1615 1620
 TAC GAC GCC GAG TAC TAC ATT GAG AAC CAG GTT CTC CCA GCC GTT GAG 5069
 Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu
 1625 1630 1635
 AGA ATT CTG AGA GCC TTC GGT TAC CGC AAG GAA GAC CTG CGC TAC CAG 5117
 Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln

1640	1645	1650	
AAG ACG AGA CAG GTT CGT TTG AGT GCT TGG CTG AAG CCG AAG GGA ACT			5165
Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp Leu Lys Pro Lys Gly Thr			
1655	1660	1665	1670
TGACCTTTCC ATTTGTTTC CAGCGATAA CCCTTTAAC TCCCTTCAA AAACCTCCCTT			5225
TAGGGAAAGA CCATGAAGAT AGAAATCCGG CGGCGCCCCG TTAAATACGC TAGGATAGAA			5285
GTCAGGCCAG ACCGGCAGGGT AGTCGTCACT GCCCCGAGGG TTCAACGTTG AGAAGTT			5341

【0058】配列番号：2

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：774

配列の種類：蛋白質

配列の型：アミノ酸

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile			
1	5	10	15
Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg			
20	25	30	
Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile			
35	40	45	
Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr			
50	55	60	
Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val			
65	70	75	80
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile			
85	90	95	
Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Gly Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr			
100	105	110	
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro			
115	120	125	
Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr			
130	135	140	
Leu Tyr His Glu Gly Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile			
145	150	155	160
Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val			
165	170	175	
Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys			
180	185	190	
Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr			
195	200	205	
Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu			
210	215	220	
Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys			
225	230	235	240
Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile			
245	250	255	
His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr			
260	265	270	
Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu			
275	280	285	
Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn			
290	295	300	
Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr			
305	310	315	320

Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
 370 375 380
 Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445
 Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460
 Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
 485 490 495
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
 530 535 540
 Phe Ala Thr Ile Pro Gln Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Met Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gln Ala Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
 705 710 715 720

Asp	Pro	Thr	Lys	His	Lys	Tyr	Asp	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Glu	Asn	Gln
							725				730				735
Val	Leu	Pro	Ala	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Arg	Ala	Phe	Gly	Tyr	Arg	Lys
							740				745				750
Glu	Asp	Leu	Arg	Tyr	Gln	Lys	Thr	Arg	Gln	Val	Gly	Leu	Ser	Ala	Trp
							755				760				765
Leu	Lys	Pro	Lys	Gly	Thr										
							770				774				

【0059】配列番号：3

配列の長さ : 2325

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：2本鎖

トポロジー；直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ATGATCCTCG ACACTGACTA CATAACCGAG GATGGAAAGC CTGTCATAAG AATTTCAG 60
AAGGAAACCG GCGAGTTAA GATTGAGTAC GACCGGACTT TTGAACCTA CTTCTACGCC 120
CTCCTGAAGG ACGATTCTGC CATTGAGGAA GTCAAGAAGA TAACCGCCGA GAGGACGGG 180
ACGGTTGTA CGGTTAACCG GGTGAAAAG GTTCAGAAGA AGTTCCCTCGG GAGACCAGT 240
GAGGCTGGA AACTCTACTT TACTCATCCG CAGGACGTCC CAGCGATAAG GGACAAGATA 300
CGAGAGCATG GAGCAGTTAT TGACATCTAC GAGTACGACA TACCCCTCGC CAAGCGCTAC 360
CTCATAGACA AGGGATTAGT GCCAATGCAA GGCACGAGG AGCTGAAAT GCTCGCTTC 420
GACATTCAA CTCTCTACCA TGAGGGCAG GAGTTCGCGG AGGGGCAAT CCTTATGATA 480
AGCTACGCCG ACGAGGAAGG GGCCAGGGT ATAACCTGGA AGAACGTGA TCTCCCCTAC 540
GTTGACGCTCG TCTCGACCGA GAGGGAGATG ATAAGCGCT TCCTCCGTG TGTGAAGGAG 600
AAAGACCCCG ACGTTCTCAT AACCTACAAC GGCACAACT TCGACTTCGC CTATCTGAAA 660
AAGCGCTGTG AAAAGCTCGG AATAAACTTC GCCCTCGGA GGGATGGAAG CGAGCGGAAG 720
ATTCAAGAGGA TGGGCACAG GTTTGCCTG GAAGTGAAGG GACGGATACA CTTCGATCTC 780
TATCCTGTGA TAAGACGGAC GATAAACCTG CCCACATACA CGCTTGAGGC CGTTTATGAA 840
GCCGTCTTCG GTCAGCCGA GGAGAAGGTT TACCGCTGAGG AAATAACACC AGCCTGGAA 900
ACCGGCAGAG ACCTTGAGAG AGTCCCCCGC TACTCGATGG AGATGCCAA GGTACACATAC 960
GAGCTTGGGA AGGAGTCTC TCCGATGGAG GCCCAGCTT CTCGCTTAAT CGGCCAGTCC 1020
CTCTGGGACG TCTCCCCTC CAGCACTGGC AACCTCGTT AGTGGTTCCCT CCTCAGGAAG 1080
GCCTATGAGA GGAATGAGCT GGCCCCAAC AACCCCGATG AAAAGGAGCT GGCCAGAAGA 1140
CGGCAGAGCT ATGAAGGAGG CTATGAAAA GAGCCCGAGA GAGGGTTGTG GGAGAACATA 1200
GTGTACCTAG ATTTTAGATC CCTGTACCCC TCAATCATCA TCACCCACAA CGTCTGCCG 1260
GATACGCTCA ACAGAGAAGG ATGCAAGGAA TATGACGTTG CCCCCACAGGT CGGCCACCCG 1320
TTCTGCAAGG ACTTCCCAGG ATTTATCCCG AGCCTGCTT GAGACCTCCT AGAGGAGAGG 1380
CAGAAGATAA AGAAGAAGAT GAAGGCCACG ATTGACCCGA TCGAGAGGAA GCTCCTCGAT 1440
TACAGGCAGA GGGCCATCAA GATCTGGCA AACAGCTACT ACGGTTACTA CGGCTATGCA 1500
ACGGCCGCCCT GGTACTCCAA GGAGTGTGCA GAGAGCGTAA CGGCTGGGG AAGGGAGTAC 1560
ATAACGATGA CCATCAAGGA GATAGAGGAA AAGTACGGCT TTAAGGTAAT CTACAGCGAC 1620
ACCGACGGAT TTTTGCAC AATAACCTGGA GCGGATGCTG AAACCGCTAA AAAGAAGGCT 1680
ATGGAGTTC TCAACTATAT CAACCCAAA CTTCCGGCG CGCTTGAGCT CGAGTACGAG 1740
GGCTTCTACA AACGCCGCTT CTTCGTCACG AAGAAGAAGT ATGCGGTGAT AGACGAGGAA 1800
GGCAAGATAA CAACGCCGGG ACTTGAGATT GTGAGGCCTG ACTGGAGCGA GATAGCGAAA 1860
GAGACGCAAGG CGAGGGTCT TGAAGCTTG CTAAAGGAGC GTGACGCTGA GAAGGCCGTG 1920
AGGATAGTCA AAGAAGTTAC CGAAAAGCTG AGCAAGTACG AGGTTCCGCC GGAGAAGCTG 1980
GTGATCCACG AGCACATAAC GAGGGATTAA AAGGACTACAA AGGCAACCGG TCCCCACCGT 2040
GCCGTTGCCA AGAGGTTGGC CGCGAGAGGA GTCAAAATAC GCGCTGGAAC GGTGATAACC 2100
TACATCGTGC TCAAGGGCTC TGGGAGGATA GGGCACAGGG CGATACCGTT CGACGAGTTC 2160
GACCCGACGA AGCACAAAGTA CGACCCCGAG TACTACATTG AGAACCGAGT TCTCCAGCC 2220
GTTGAGAGAA TTCTGAGAGC CTTCGTTAC CGCAAGGAAG ACCTCGCTA CCAGAAGAGC 2280
AGACAGGTTG GTTGAGTGC TTGGCTGAAC CGGAAGGGAA CTTGA 2325

【0060】配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

CTTTGCTCA GATCTCTT CCTG 24

【0061】配列番号：5

配列の長さ：36

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AGCTGAAAAT GCTAGCCTTC GACAATGAAA CTCTCT 36

【0062】配列番号：6

配列の長さ：36

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AGCTGAAAAT GCTAGCCTTC GACGAAGAAA CTCTCT 36

【0063】配列番号：7

配列の長さ：33

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

GAAAATGCTC GCCTTGATC AAGAAACTCT CTA 33

【0064】配列番号：8

配列の長さ：36

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AGCTGAAAAT GCTAGCCTTC GACGATGAAA CTCTCT 36

【0065】配列番号：9

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

CGCCTTCGAC ATTGAAGTAC TCTACCATGA 30

【0066】配列番号：10

配列の長さ：36

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AGCTGAAAAT GCTAGCCTTC GACAGAGAAA CTCTCT 36

【0067】配列番号：11

配列の長さ：36

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AGCTGAAAAT GCTAGCCTTC GACGAAGAAA CTCTCT 36

【0068】配列番号：12

配列の長さ：35

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AAAAAGTACT CACCAAGTCAC AGAAAAGCAT CTTAC 35

【0069】配列番号：13

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

AAAAAGTACT CAACCAAGTC ATTCTTGAGA ATAGT 34

【図面の簡単な説明】

【図1】耐熱性DNAポリメラーゼのエキソ（EXO）領域のアミノ酸配列を示す図である。

【図2】改変型DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNA分解率を示す図である。

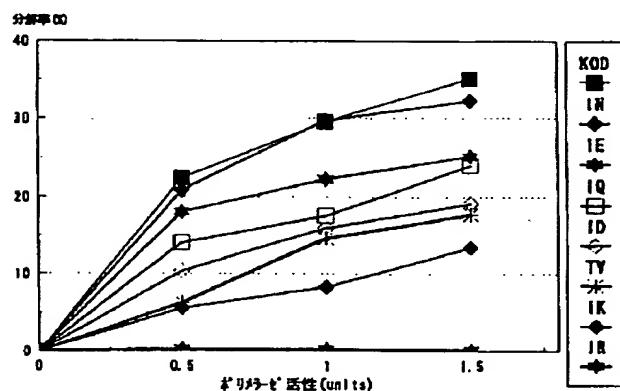
【図3】天然型KODとのエキソヌクレアーゼ活性の比率を示す図である。

【図4】改変型DNAポリメラーゼを用いたPCRの結果を示す図である。

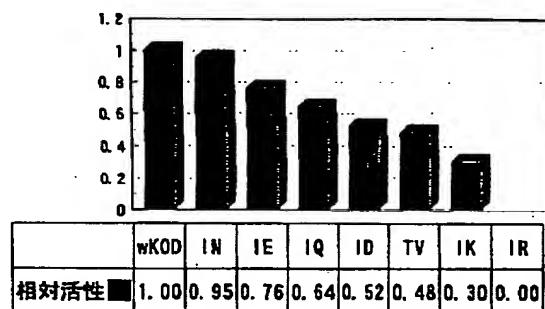
【図1】

	EXO I	EXO II	EXO III
KOD	MIAFDIETLY	LITTINGDNDFAYLKKR	VAKYSMEDAKV
Pfu	I LAFDIETLY	I VTYNGDSDPDPYLKR	VAKYSMEDAKA
Vent	I LAFDIETPY	I ITINGDNDFDLPYLKR	VAKYSMEDAKA
Deep Vent	I LAFDIETLY	I ITINGDSDFDLPYLKR	VAKYSMEDAKV

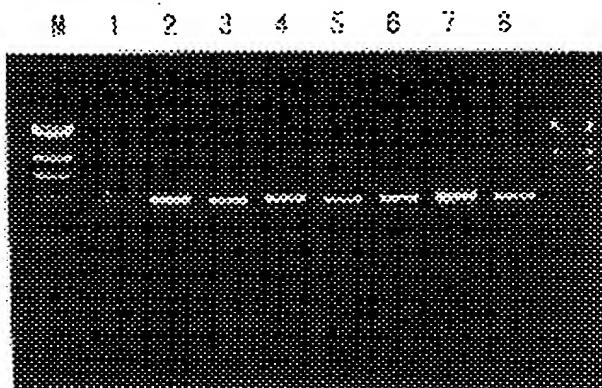
【図2】



【図3】



【図4】



Lane (1)~(9)
1 2 3 4 5 6 7 8
9
結果 A / B は同じである。

【手続補正書】

【提出日】平成8年9月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】 改変型DNAポリメラーゼを用いたPCRの結果を示す電気泳動の写真である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
(C 1 2 N 9/12
C 1 2 R 1:19)

(72) 発明者 川上 文清
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株
式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 高木 昌宏
大阪府吹田市青山台1丁目3 C-58-207

(72) 発明者 今中 忠行
大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号